Title	肝細胞移植における肝細胞スフェロイドの有用性に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	渋谷, 一陽
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14619号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/82960
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Туре	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号: 2635
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Kazuaki_Shibuya_abstract.pdf (論文内容の要旨)



### 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(医学) 氏名 渋谷 一陽

学位論文題名

肝細胞移植における肝細胞スフェロイドの有用性に関する研究 (The efficacy of hepatocyte spheroid for hepatocyte transplantation)

### 【背景と目的】

肝細胞移植は急性肝不全や代謝性肝疾患に対して行われている治療であり、特にその低侵襲性から、肝臓移植に代わる次世代の治療法として応用が期待される。しかし、これまでの臨床肝細胞移植の報告では、多くの症例で病態の改善を一時的に認めるものの、最終的に肝臓移植が必要となる。肝細胞移植の問題点として、移植される single hepatocyte(SH) が肝臓からの単離精製過程で傷害を受け、その機能が低下すること、また、移植によって惹起される自然免疫応答により移植された SH の大部分が失われ、長期生着が得られないことが挙げられる。SH から構築される肝細胞スフェロイド(spheroidal hepatocyte: SP)は、より肝臓組織に近い細胞環境を有し、SH と比較して構造的に強固であるとともに、高い viabilityを保ち、肝特異的機能を維持していることから、肝細胞移植に応用できる可能性がある。本研究の目的は肝細胞移植における SP の有用性を検討することである。

# 【方法】

C57BL/6Jマウス肝臓から肝細胞を単離し、Hanging drop 法で SP を生成した。SP の viability 測定、組織学的評価、肝細胞特異的機能評価として細胞内 mRNA(albumin(alb), ornithine transcarbamylase (otc), coagulation factor 7 (f7), coagulation factor 9 (f9), glucose-6-phosphate (g6p), apolipoprotein E (apoe), alpha-1-antitrypsin (a1at), low density lipoprotein recepter (ldlr))発現量、培養液中のアルブミン、尿素、Apolipoprotein E (ApoE)各濃度を、同細胞濃度で collagen coat dish 上で 3 日間単層培養した SH (cSH)とそれぞれ比較した。マウス肝細胞移植モデルとして、単離直後の single hepatocyte(fSH)、SP をそれぞれ Apo E knockout(-/-)マウスの肝臓内に経門脈的に移植した。移植後の血清 ApoE 濃度を経時的に測定するとともに、移植された SH、SP の機能評価、形態学的評価を組織学的に行なった。肝細胞移植後の肝臓内の炎症反応を評価するため、移植 6 時間後の肝臓を摘出し、interleukin-1β(IL-1β), interleukin-6(IL-6), tumor necrotic factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), macrophage inflammatory protein  $1\beta$  (MIP- $1\beta$ ), monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) のmRNA 発現量を評価した。SP の異所性肝細胞移植への応用を検討するため、fSH、SP をそれぞれ腎皮膜下、皮下に移植し、移植 1 ヶ月後に組織学的評価を行った。

### 【結果】

Hanging drop 法で肝細胞を培養すると、3 日目には大きさ約 200 μm の SP が観察され内部

は CK18 で染色された。生成直後の SP における alb, otc, f7, f9, apoe, a1at, ldlr の mRNA 発 現量は cSH と比較して有意に高値であった。また、培養液中のアルブミン、尿素、ApoE 各 濃度は cSH と比べ SP で高値であった。生成後の SP の viability、Alb mRNA 発現量は回収 直後から6時間後までほぼ変わらず維持されており、SPが肝細胞移植に応用可能であると 判断した。一方、fSH の viability、Alb mRNA 発現量は単離直後から急速に低下した。移植 直前の fSH の ApoE mRNA 発現量は SP と比べ有意に高値であった。しかし、移植後マウ スの血清 ApoE 濃度は、SP 移植群で高い傾向がみられた。肝細胞移植後の組織学的評価で は SP 移植後 4 日目で門脈内に ApoE 陽性の SP を認め、7 日目で SP は平らな形状に変化 し門脈壁に広がって接するとともに肝臓実質内にも ApoE 陽性細胞が認められた。SP 移植 後 28 日目の Elastica-Masson 染色を含む組織学的評価では、門脈内に存在する SP の表面 は新たな内皮細胞で覆われており、さらに門脈の内皮細胞を超えて肝実質内にも ApoE 陽 性細胞は存在していた。一方、SH 移植後 4 日目の組織学的評価では孤立した ApoE 陽性細 胞が肝臓実質内に散見され、移植後 28 日後でも同様の所見であったが、門脈内には ApoE 陽性細胞は認めなかった。 肝細胞移植 6 時間後の肝臓内の炎症性サイトカイン(IL-1β, IL-6, TNF-α, MIP-1β, MCP-1)mRNA 発現量は、SH 移植群、SP 移植群ともに正常肝と比較し 有意な上昇を認めたものの、SH 移植群、SP 移植群の間で統計学的有意差はなかった。 腎皮膜下、及び皮下への移植後1ヶ月目の組織学的評価で、SP 移植群では ApoE 陽性の肝 細胞を腎皮膜下、皮下それぞれの移植部位に認めた一方、SH 移植群では移植部位に ApoE 陽性細胞は認められなかった。

#### 【考察】

3日間培養後の SP はアルブミン産生などの肝臓特異的機能を維持しているとともに、その機能は浮遊状態でも長時間維持されており、SP が肝細胞移植において有用な細胞形態出ることが示唆された。SP は 3 次元培養により細胞間シグナル伝達が強化されることで、細胞機能の亢進を認めるという過去の報告と矛盾しない結果であった。移植直前の ApoE mRNA 発現量は SP と比べ fSH で高値であるにも関わらず、肝細胞移植後の血清 ApoE 濃度は SP 移植群で高い傾向を示した。また、移植後肝臓内の炎症反応は SH、SP 両移植群で有意差を認めなかった。これらの結果から、SH の viability は単離直後から低下するため、移植直前にはさらに低下している可能性があること、SP が構造的に強固であり、移植後の自然免疫応答による細胞傷害に対して SH よりも耐久性がある可能性があること、SP は生成期では遺伝子の発現が抑制されているとの報告があり、移植後完全な機能回復には時間がかかる可能性があること、などが考えられた。腎皮膜下、皮下への異所性移植の組織学的検討では SP 移植群でのみ ApoE 陽性細胞が認められ、SP の肝臓以外への移植への応用も期待できる。

## 【結論】

肝細胞スフェロイドは現状の肝細胞移植で用いられている single hepatocyte に変わりうる有望な細胞形態である。